

N° D'ORDRE

25

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE D'INGÉNIEUR DOCTEUR

PAR

Paul HEITZ

Ingénieur Chimiste (E. C. I. L.)

1^e THÈSE. — NOUVELLES MÉTHODES DE DOSAGE SPÉCIFIQUE DE QUELQUES ACIDES AMINÉS : ALANINE, VALINE, LEUCINE, SÉRINE ET ACIDE ASPARTIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le, **18 JUIL 1939** 1939, devant la Commission d'Examen

MM. MEUNIER, *Président.*
FROMAGEOT, *Examineur.*
DESNUELLE —

LYON
BOSC Frères M. & L. RIOU
IMPRIMEURS-ÉDITEURS
42, Quai Gailleton, 42

1939

**Nouvelles méthodes de dosage spécifique
de quelques acides aminés :
Alanine, valine, leucine, sérine et acide aspartique**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

N° D'ORDRE

25

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE D'INGÉNIEUR DOCTEUR

PAR

Paul HEITZ

Ingénieur Chimiste (E. C. I. L.)

1^e THÈSE. — NOUVELLES MÉTHODES DE DOSAGE SPÉCIFIQUE DE QUELQUES ACIDES AMINÉS : ALANINE, VALINE, LEUCINE, SÉRINE ET ACIDE ASPARTIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le

1939, devant la Commission d'Examen

MM. MEUNIER, *Président.*

FROMAGEOT, *Examineur.*

DESUELLE —

LYON

BOSC Frères M. & L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

42, Quai Gailleton, 42

1939

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. DOUIN, *, ☼, ☽ I., *Botanique.*

Assesseur

M. VANEY, *, ☽ I., ☼.

Doyen honoraire

M. LONGCHAMBON, *, ☼, ☽ I., ☼.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, C. *, ☽ I.

RIGOLLOT, *, ☽ I.

COUTURIER, *, ☽ I., ☼.

Professeurs

MM. DULAC, *, ☽ I., *Calcul différentiel et intégral.*

N....., *Botanique.*

MEUNIER, O. *, ☽ I., *Chimie industrielle.*

SIRE, *, ☽ I., ☼, *Mécanique rationnelle et appliquée.*

VANEY, *, ☽ I., ☼, *Zoologie.*

CARDOT, *, ☽ I., *Physiologie générale.*

ROMAN, *, ☽ I., *Géologie.*

LOCQUIN, *, ☽ I., *Chimie générale.*

LONGCHAMBON, *, ☼, ☽ I., ☼, *Minéralogie.*

DÉJARDIN, *, ☽ I., *Physique générale.*

SOLLAUD, ☽ I., *Zoologie.*

THIBAUD, ☽ A., *Physique expérimentale.*

LEMARCHANDS, *, ☽ I., *Chimie appliquée.*

EYRAUD, ☽ I., *Mathématiques.*

FROMAGEOT, ☽ A., *Chimie biologique.*

AUMÉRAS, ☽ A., *Chimie physique.*

Maîtres de conférences et chargés de cours

MM. DŒUVRE, ☽ I., *Chimie organique.*

PRETTRE, *Chimie minérale.*

KÜHNER, *Botanique.*

LAVAL, *Minéralogie.*

Maître de conférences adjoint

M. BONNET, *, ☽ I., *Zoologie générale et agricole.*

Chargés de cours complémentaires

M^{lle} BACHRACH, ☽ I., *Physiologie.*

MM. DUFAY, *Astronomie et Physique supérieure.*

VIRET, ☽ I., *Etude des roches.*

RANSON, *Géométrie supérieure.*

TRONCHET, ☽, *Botanique.*

MAYET, *, ☽ I., ☼, *Anthropologie.*

PELOSSE, ☽ I., *Sériciculture.*

DARESTE DE LA CHAVANNE, ☽ I., *Géographie physique.*

SEYEWETZ, *, ☽ I., *Matières colorantes artificielles.*

Secrétaire

M. ROUX, ☽ A.



Nouvelles méthodes de dosage spécifique
de quelques acides aminés :
Alanine, valine, leucine, sérine et acide aspartique

INTRODUCTION

Chacun des vingt-trois acides aminés naturels actuellement connus n'est pas toujours susceptible d'être dosé spécifiquement, ou même seulement qualitativement caractérisé, lorsqu'il se trouve en présence d'un mélange quelconque des autres. La possibilité de mise en évidence, aussi bien quantitative que qualitative, d'un acide aminé donné repose, en effet, sur l'existence de caractères différentiels de cet acide aminé ; toutes les méthodes de dosage ont ainsi cherché à utiliser ces caractères différentiels ; et c'est ainsi que ce sont les acides aminés possédant les fonctions les plus marquantes, qui ont fait l'objet des premières méthodes de ce dosage, et qui sont le plus facilement caractérisés : des exemples classiques en sont offerts par la tyrosine et son noyau phénolique, le tryptophane et son noyau indol, la cystéine et son groupement sulfhydryl, etc...

Inversement, il existe encore actuellement une série d'acides aminés, appartenant plus particulièrement au groupe des acides monoaminés monocarboxyliques aliphatiques, dont la molécule n'offre, à première vue, aucun caractère distinctif bien net, et qui n'ont pu ainsi, jusqu'ici, donner prise à l'établissement de procédés de dosages vraiment spécifiques. C'est là une lacune qui mérite d'être comblée.

En effet, le manque de moyens actuels permettant le

dosage spécifique de ces aminoacides rend l'étude de leur métabolisme extrêmement difficile ; l'étude de leur synthèse biologique, par exemple, particulièrement importante puisqu'il s'agit ici des acides aminés les plus simples, nécessite forcément leur isolement en nature, opération longue et pénible, sans que l'on puisse, par des expériences préliminaires, s'assurer de la formation ou de la présence de l'acide aminé en question [1]. A un autre point de vue, l'analyse complète de substances protéiques, en ce qui concerne leur teneur en aminoacides, est encore impossible à réaliser lorsque l'on ne dispose que de faibles quantités (quelques décigrammes) de ces substances.

Il m'a ainsi paru intéressant de chercher à mettre au point des procédés de dosage pour les plus déshérités à cet égard des acides aminés, notamment pour l'alanine, la valine, la leucine et la sérine.

Le présent travail comporte deux parties principales, dont la distinction repose sur la nature des techniques mises en œuvre :

I. Dosage spécifique de l'alanine et de la somme sérine+acide aspartique.

II. Dosage spécifique de la valine et de la leucine.

Ce travail a été exécuté entièrement au laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Lyon, sous la direction de M. Fromageot, que je suis heureux de remercier ici.

PREMIERE PARTIE

METHODE DE DOSAGE SPECIFIQUE DE L'ALANINE ET DE LA SOMME SERINE + ACIDE ASPARTIQUE

Le dosage de l'alanine dans les mélanges d'acides aminés, résultant par exemple de l'hydrolyse de matières protéiques, n'a été généralement fait jusqu'ici que par la technique classique de E. Fischer, consistant à transformer les différents acides aminés en leurs esters éthyliques que l'on sépare ensuite par distillation fractionnée.

Cette méthode étant inapplicable à de faibles quantités d'acides aminés, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode pratique permettant le dosage de petites quantités d'alanine en présence d'autres acides aminés quelconques ; la méthode que A. I. Kendall et Th. E. Friedemann [2] ont préconisée à cet effet et qui est basée sur la transformation de l'alanine en acide lactique, transformation suivie du dosage de cet acide sous forme d'acétaldéhyde par la méthode au bisulfite, est loin d'être spécifique ; elle ne permet pas, en effet, de distinguer l'alanine des autres acides aminés qui, dans les conditions expérimentales réalisées, donnent naissance à des aldéhydes supérieurs facilement entraînaibles par la vapeur d'eau, comme le font la valine et la leucine, ni, à plus forte raison, de ceux qui, comme le font la sérine et l'acide aspartique, donnent également de l'acétaldéhyde (voir tableau II).

O. Furth et ses collaborateurs [3] ont cherché à remédier à ce manque de spécificité de la méthode de Kendall

et Friedemann en essayant de séparer, par une sorte d'entraînement fractionné, l'acétaldéhyde correspondant à l'alanine, des aldéhydes supérieurs provenant des autres acides aminés ; mais la méthode qu'ils indiquent est loin d'avoir la spécificité désirée : d'une part, en effet, la séparation quantitative des aldéhydes en question apparaît comme compliquée et assez aléatoire ; d'autre part, la formation d'acétaldéhyde n'est pas caractéristique de l'alanine dans les conditions réalisées, puisque cet aldéhyde est également donné, dans ces conditions, par la sérine et l'acide aspartique.

Devant l'intérêt évident présenté par le dosage des acides monoaminés monocarboxyliques simples dans les milieux biologiques complexes, nous avons cherché à modifier la méthode de Kendall et Friedemann de façon à la rendre spécifique et nous avons ainsi mis au point une technique permettant de doser en présence d'une série d'autres acides aminés, d'une part l'alanine seule, et d'autre part la somme alanine+sérine+acide aspartique.

Cette technique comporte les opérations suivantes :

1° Transformation, suivant la méthode de Kendall et Friedemann, du mélange des acides aminés en les hydroxyacides correspondants.

2° Oxydation de ces acides dans des conditions telles que :

a) sur une fraction déterminée, seul l'acide lactique correspondant à l'alanine donne de l'acétaldéhyde ;

b) sur une autre fraction, seuls les acides lactique, glycérique et malique, correspondant respectivement à l'alanine, à la sérine et à l'acide aspartique, donnent quantitativement de l'acétaldéhyde.

3° Dosage spécifique (par colorimétrie) de l'acétaldéhyde produit dans les opérations précédentes.

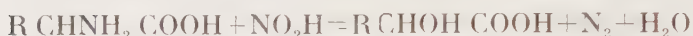
La première détermination indique la teneur en alanine ; la différence entre la deuxième et la première détermination donne la teneur en sérine+acide aspartique.

Il n'a pas encore été possible de trouver des conditions d'oxydation telles que l'on puisse obtenir quantitativement de l'acétaldéhyde à partir de la sérine, sans qu'il s'en forme notablement à partir de l'acide aspartique, ou inversement. La méthode en question ne permet donc pas de doser isolément la sérine ou l'acide aspartique, lorsque ces deux acides aminés sont en présence ; mais on sait qu'il est relativement facile d'éliminer l'acide aspartique sous forme de sel de baryum [4], ce qui permet le dosage spécifique de la sérine, et par conséquent la détermination spécifique également, par différence, de l'acide aspartique.

TECHNIQUE

1° Transformation des acides aminés en les hydroxyacides correspondants

Cette transformation correspond à la réaction :



Elle est faite selon la méthode de Kendall et Friedemann.

Appareillage : L'appareillage comporte un flacon jaugé (100 cc. à 200 cc.), en verre Pyrex, et une boule à brôme dont l'extrémité est étirée en capillaire, et suffisamment allongée pour pouvoir atteindre le fond du flacon.

Réactifs : Les réactifs utilisés sont les suivants : une solution d'urée pure à 7,5 %, une solution de nitrite de sodium pur à 2,5 %, et de l'acide sulfurique normal.

Mode opératoire : On introduit dans le flacon jaugé le milieu soumis à l'analyse et contenant de 10 à 60 mg. du mélange des acides aminés ; on ajoute ensuite de l'eau distillée, de telle sorte que l'on ait un volume de 75 cc., puis 0,25 cc. d'acide sulfurique normal. Le flacon renfermant ainsi la solution acide des acides aminés est placé au bain-marie bouillant où il atteint une température voisine de 95°. On ajoute alors 15 cc. de la solution de NO_2Na ; cette addition se fait de la façon suivante : la solution de nitrite étant placée dans la boule à brôme, on la laisse lentement couler dans la solution des acides aminés, à raison de 1 cc. par minute, et en ayant soin que l'extrémité de la boule à brôme descende bien jusqu'au fond du flacon ; ce dernier est agité fréquemment. Dès

que la boule à brôme est vide, on y introduit 15 cc. de la solution d'urée que l'on fait couler dans le flacon jaugé dans les mêmes conditions et avec les mêmes précautions que précédemment. Quand l'addition de la solution d'urée est terminée, on enlève le flacon du bain-marie, on en rince soigneusement le col avec de l'eau distillée, et le laisse refroidir avant de compléter au trait.

Remarque. — Si, en dehors des acides aminés, il se trouvait dans la solution des substances qui, comme les hydrates de carbone, peuvent gêner le dosage ultérieur de l'acide lactique, il conviendrait de les éliminer en introduisant, avant de compléter le volume du flacon jaugé, 10 cc. d'une solution à 20 % de sulfate de cuivre et 10 cc. d'une suspension d'hydroxyde de calcium à 20 % dans l'eau ; on agite énergiquement, puis on complète au trait. On filtre ensuite dans un flacon sec et prélève des fractions aliquotes pour les opérations suivantes :

2° Oxydation des hydroxyacides avec production des aldéhydes correspondants

Cette oxydation est représentée par la réaction :



Appareillage : On utilise ici l'appareil classique de Th. E. Friedemann, M. Cotonio et A. Shaffer [5] pour le dosage de l'acide lactique.

Réactifs : On emploie les réactifs suivants : solution de MnO_4K 0.2 N ; solution de SO_4Mn à 10 % ; solution de PO_4H_3 2 N ; solution saturée de CO_3NaH ; solution de SO_3NaH à 1 % ; solution titrée d'iode 0,1 N ; solution titrée d'iode 0,01 N ; solution de $(CH_3COO)_2Hg$ à 5 % ; cette dernière solution contient en outre 1 cc. d'acide acétique pur pour 100 cc. ; empois d'amidon.

Mode opératoire

a) POUR L'OBTENTION QUANTITATIVE D'ACÉTALDÉHYDE A PARTIR DE L'ACIDE LACTIQUE SEUL ; DOSAGE DE L'ALANINE SEULE.

L'appareil étant monté comme d'habitude, on y introduit un volume connu de la solution des hydroxyacides obtenus au cours de l'opération précédente ; on ajoute 10 cc. de la solution de PO_4H_3 , puis la quantité de SO_4Mn nécessaire pour que le milieu renferme 2 % de SO_4Mn (soit 10 cc. pour un volume total de 50 cc.) ; on introduit enfin dans le milieu le dixième de son volume de la solution d'acétate mercurique, puis une pincée de talc. L'appareil est alors mis en marche dans les conditions habituelles ; lorsque l'ébullition commence, l'on introduit la solution de MnO_3K à raison d'une goutte toutes les secondes, pendant 10 minutes. On maintient l'ébullition pendant une dizaine de minutes après la fin de l'addition du réactif ; on arrête ensuite l'appareil et après les lavages usuels, on ajoute de l'emploi d'amidon à la solution de bisulfite, détruit celle-ci d'abord par l'iode 0,1 N puis par l'iode 0,01 N, selon la technique classique. On ajoute ensuite 10 cc. de la solution saturée de CO_2NaH . et détruit exactement le bisulfite libéré par l'iode 0,01 N.

b) POUR L'OBTENTION QUANTITATIVE D'ACÉTALDÉHYDE A PARTIR DE LA SOMME ACIDE LACTIQUE+ACIDE GLYCÉRIQUE+ACIDE MALIQUE : DOSAGE DE LA SOMME ALANINE+SÉRINE+ACIDE ASPARTIQUE.

L'oxydation par le permanganate diffère ici de ce qu'elle est dans le cas précédent, par les points suivants :

- La réaction se fait en absence d'acétate mercurique.
- La concentration du sulfate de manganèse introduit est double (20 cc. de la solution de SO_4Mn pour un volume total de 50 cc.) de ce qu'elle est pour le dosage de l'alanine seule.

— La solution de permanganate est introduite à raison d'une goutte toutes les trois à quatre secondes, pendant 60 minutes ; l'ébullition étant maintenue 10 minutes après la cessation de l'introduction du réactif.

3° Dosage de l'acétaldéhyde

Le dosage de l'acétaldéhyde se fait par colorimétrie, en utilisant la réaction que donne cette substance avec le nitroprussiate de sodium en présence de pipérazine.

Appareillage : Nous nous servons ici du spectrophotomètre de Jobin et Yvon.

Réactifs : Une solution fraîche (immédiatement préparée) de nitroprussiate de sodium à 4 %, et une solution de pipérazine obtenue en dissolvant 25 g. de pipérazine dans 75 cc. d'eau distillée, ce qui correspond sensiblement à la solution saturée.

Mode opératoire : La solution obtenue au cours des opérations précédentes contient de l'aldéhyde libéré du bisulfite, ce dernier ayant été détruit ensuite par l'iode. On supprime toute trace de coloration bleue par addition d'une goutte d'hyposulfite 0,1 N et on transvase la solution, quantitativement, dans un ballon jaugé de 100 cc. On complète au trait.

Sur les 100 cc. ainsi obtenus, on prélève 6 cc. que l'on place dans un tube à essais susceptible d'être bouché à l'émeri, et dans lequel on introduit ensuite 0,5 cc. de la solution de nitroprussiate de sodium et 1,5 cc. de la solution de pipérazine ; on agite alors le tube énergiquement, puis on en verse le contenu dans la cuve d'absorption (épaisseur=1 cm.) du spectrophotomètre, avec les précautions d'usage. L'intensité de la coloration croît assez rapidement ; on la suit en se plaçant sur la longueur d'onde de 5.600 Å. Après deux à trois minutes, la coloration atteint son maximum que l'on détermine par plusieurs lec-

tures, dont les écarts sont d'ailleurs négligeables, et dont on prend la moyenne ; l'on obtient ainsi pour la solution étudiée une certaine densité D.

On a préparé d'autre part une solution témoin contenant la même concentration de chacun des réactifs utilisés précédemment, à savoir 10 cc. de SO_3NaH à 1 % + 1 cc. d'empois d'amidon, traitée par l'iode 0,1 N jusqu'à coloration bleue, décolorée par addition d'une goutte d'hyposulfite, additionnée de 10 cc. de la solution saturée de CO_3NaH , et amenée à 100 cc. exactement, par addition d'eau distillée. Sur ces 100 cc. ne contenant pas d'aldéhyde, on prélève 6 cc. que l'on additionne de nitroprussiate et de pipérazine de la même façon que précédemment. Soit d la densité optique de la solution ainsi obtenue, mesurée au spectrophotomètre ; la différence $D-d$ représente l'absorption, pour la longueur d'onde 5.600 Å et sous 1 cm. d'épaisseur, de la couleur bleue développée par la réaction entre l'acétaldéhyde, le nitroprussiate et la pipérazine. On déduit de cette valeur la concentration en acétaldéhyde, en la portant sur la courbe étalon représentant les densités en fonction de la concentration en aldéhyde.

Obtention de la courbe étalon : La courbe étalon représentant les densités optiques en fonction de la concentration en alanine ou en acétaldéhyde, s'obtient de la façon suivante :

On part d'une quantité convenable de solution d'acétaldéhyde que l'on ajoute à 10 cc. de la solution de bisulfite à 1 % ; on détruit l'excès de bisulfite par addition d'abord d'iode 0,1 N, puis d'iode 0,01 N ; on introduit ensuite 10 cc. de la solution saturée de bicarbonate de sodium, et détermine la teneur exacte en acétaldéhyde par dosage du bisulfite libéré, par l'iode 0,01 N. La solution d'acétaldéhyde est alors amenée exactement à 100 cc.

On a d'autre part préparé une solution témoin, sans acétaldéhyde, comme il a été dit précédemment,

On dispose d'une série de tubes à essais dans lesquels on introduit les solutions selon les proportions indiquées ci-dessous (tableau I) ; on ajoute ensuite à chacun des tubes 0,5 cc. de la solution de nitroprussiate et 1,5 cc. de la solution de pipérazine, l'on agite soigneusement puis l'on exécute la mesure colorimétrique dans les conditions qui ont été précisées plus haut. La différence de densité optique ($D - d$) entre chacun des tubes 1 à 6 et le témoin, en fonction des concentrations en aldéhyde, est donnée par le tableau I. Les chiffres de ce tableau permettent de construire la courbe représentative des variations de $D - d$ en fonction de la quantité d'aldéhyde ; cette courbe est sensiblement une droite.

TABLEAU I

Etablissement de la courbe étalon pour le dosage colorimétrique de l'acétaldéhyde. Les densités mesurées sous une épaisseur de 1 cm. correspondent à $\lambda=5.600 \text{ \AA}$.

Désignation des tubes	Solution acétaldéhyde cc.	Solution témoin cc.	Acétaldéhyde mg.	$D - d$
témoin	0	6	0	($d=0,51$)
1	1	5	0,062	0,19
2	2	4	0,124	0,39
3	3	3	0,186	0,60
4	4	2	0,249	0,77
5	5	1	0,311	0,98
6	6	0	0,373	1,17

DISCUSSION DE LA METHODE

a) OBTENTION QUANTITATIVE D'ACÉTALDÉHYDE A PARTIR DE L'ACIDE LACTIQUE SEUL : DOSAGE DE L'ALANINE SEULE.

Il convient de discuter tout d'abord les conditions dans lesquelles l'on doit opérer pour assurer à la méthode de

dosage en question toute sa spécificité vis-à-vis de l'alanine.

Nous avons constaté en premier lieu que la méthode de Friedemann et Kendall, telle qu'elle est décrite par ces auteurs, n'est nullement spécifique de l'alanine : c'est ce que montre la première partie du tableau II dont les chiffres correspondent à des résultats obtenus, en présence de SO_4Mn , dans les conditions exactes prescrites par les auteurs américains. On voit, d'après ces chiffres, que non seulement l'alanine, mais aussi la sérine, l'acide aspartique, la valine, la leucine, donnent des quantités d'aldéhydes très importantes ; et que l'acide glutamique, le glycocolle, et même des acides aminés comme la tyrosine et le tryptophane, fournissent des aldéhydes en proportions non négligeables. Parmi cet ensemble d'acides aminés fournissant des aldéhydes, on doit distinguer ceux qui, comme la valine, la leucine, etc., fournissent des aldéhydes différents de l'acétaldéhyde, des trois acides aminés : alanine, sérine et acide aspartique, qui donnent de l'acétaldéhyde facilement reconnaissable par sa réaction avec le nitroprussiate et la pipérazine. En effectuant le dosage de l'acétaldéhyde, non plus par la méthode au bisulfite, mais par colorimétrie, en utilisant précisément cette réaction au nitroprussiate, on augmente donc la spécificité de la méthode, en éliminant du dosage tous les acides aminés autres que les trois dont il vient d'être question. Il restait à tenter le dosage séparé de chacun d'eux ; en ce qui concerne l'élimination de la sérine, un travail de C. Neuberg [6] nous a conduits à une observation intéressante : cet auteur a signalé, en effet, que la sérine est transformée en acétaldéhyde lorsqu'elle est traitée par H_2O_2 en présence de sels ferriques ; nous avons comparé cette réaction avec l'oxydation par le permanganate, de l'acide glycérique provenant de la désamination de la sérine, oxydation faite en présence de SO_4Mn , et avons supposé que l'absence de SO_4Mn agissant en

catalyseur, empêcherait la formation d'acétaldéhyde au cours de cette réaction. L'expérience vérifie pleinement la justesse de cette hypothèse comme on peut le voir dans la deuxième partie du tableau II, dont les chiffres correspondent à des résultats obtenus en l'absence de SO_4Mn , les autres conditions expérimentales restant les mêmes.

Inversement, en augmentant la concentration en SO_4Mn , l'on améliore la formation d'acétaldéhyde à partir de la sérine, en atteignant un rendement de 90 % ; une amélioration du rendement en aldéhyde peut être obtenue également en augmentant la durée de l'oxydation sans augmenter la concentration en SO_4Mn ; en augmentant simultanément la concentration en sulfate de manganèse et la durée de l'oxydation (60 à 70 minutes), on obtient un rendement de 93 à 95 % dans la production d'acétaldéhyde à partir de la sérine (tableau III).

TABLEAU II

Formation d'aldéhyde à partir d'hydroxyacides provenant de la désamination d'une série d'acides aminés selon la technique de Kendall et Friedemann. L'oxydation par le permanganate dure 20 minutes et a lieu soit en présence, soit en absence de SO_4Mn , la technique suivie étant celle de Kendall et Friedemann.

I = cc. d'iode 0,01 N correspondant aux aldéhydes devant théoriquement se former.

II et II' = cc. d'iode 0,01 N correspondant aux aldéhydes expérimentalement formés.

III et III' = Acides aminés calculés d'après II et II'.

IV et IV' = Rapport, en pour-cent, de la quantité d'acides aminés trouvés expérimentalement à la quantité théorique.

Le volume de la solution à oxyder est de 50 cc. y compris la solution de SO_4Mn .

Acides aminés traités en mg.	I	Avec SO ₄ Mn II	III	IV	Sans SO ₄ Mn II'	III'	IV'
Alanine							
6,6	14,8	14,7	6,5	99,0	14,4	6,4	97,0
6,6	14,8	14,3	6,4	97,0	14,1	6,3	95,0
6,6	14,8	14,3	6,4	97,0	13,9	6,2	94,0
Sérine							
6,6	12,6	9,7	5,1	77,0	0,3	0,16	2,4
6,6	12,6	8,2	4,3	65,0	0,4	0,21	3,2
13,3	25,3	14,7	7,7	58,0	—	—	—
20,0	38,1	20,5	10,8	53,0	—	—	—
Ac. glutamique							
13,3	18,1	2,3	1,7	13,0	2,7	2,0	15,0
13,3	18,1	—	—	—	1,9	1,4	10,5
Ac. aspartique							
13,3	20,0	18,3	12,2	92,0	6,4	4,3	32,0
13,3	20,0	—	—	—	7,0	4,7	35,0
Valine + Leucine							
6,6 + 6,6	21,4	19,2	—	90,0	18,0	—	84,0
6,6 + 6,6	21,4	—	—	—	18,2	—	85,0
Glycocolle + Cystéine							
6,6 + 6,6	28,5	2,0	—	7,0	2,0	—	7,0
6,6 + 6,6	28,5	—	—	—	2,2	—	7,7
Tyrosine + Tryptophane							
6,6 + 6,6	13,5	2,0	—	15,0	1,4	—	10,4
6,6 + 6,6	13,5	—	—	—	1,9	—	14,0

TABLEAU III

Production d'acétaldéhyde à partir de l'acide glycérique provenant de la désamination de la sérine.

Le poids de sérine traitée est dans tous les cas de 6,6 mg. correspondant à 12,6 cc. de la solution I 0,01 N.

Le volume de la solution à oxyder est de 50 cc. y compris la solution de SO₄Mn.

Durée de l'oxydation par MnO ₄ K (minutes)	Solution SO ₄ Mn ajoutée cc.	cc. 10,01 N trouvés	% de la quantité théorique
25,0	0,0	0,3	2,4
25,0	10,0	9,0	71,0
65,0	10,0	11,4	90,0
45,0	20,0	10,6	84,0

En ce qui concerne l'acide aspartique, les chiffres du tableau II montrent que si son aptitude à donner de l'aldéhyde acétique est fortement diminuée en l'absence de SO_4Mn , elle n'en reste pas moins très notable. La suppression pure et simple de SO_4Mn dans la réaction d'oxydation des hydroxyacides ne suffit donc pas à éliminer l'acide aspartique comme générateur d'acétaldéhyde, ni par conséquent à assurer au dosage de l'alanine la spécificité voulue.

C'est en nous basant sur les résultats obtenus par G. Denigès [7] que nous sommes arrivés à la technique permettant de supprimer la formation d'acétaldéhyde à partir de l'acide aspartique et de la sérine. D'après Denigès, en effet, l'acide malique, traité à chaud par une quantité suffisante de MnO_4K , donne lieu à la formation d'acétaldéhyde, accompagnée par un dégagement de CO_2 ; c'est là une réaction brutale ; mais si on ajoute à la solution d'acide malique du permanganate, avec précaution et en quantité convenable, on remarque que la décoloration du réactif se fait sans dégagement notable de CO_2 : l'acide malique est simplement oxydé à l'état d'acide oxalacétique. Or ce dernier acide donne avec l'acétate mercurique une combinaison insoluble à chaud ; il en résulte que si on ajoute à une solution d'acide malique très étendue, le dixième de son volume d'une solution d'acétate mercurique (à 5 g. de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$ et 1 cc. d'acide acétique pur pour 100) que l'on porte à l'ébullition et que l'on ajoute goutte à goutte du permanganate à 2 %, il apparaît dès les premières gouttes un précipité blanc formé par la combinaison mercurielle de l'acide oxalacétique provenant de l'oxydation de l'acide malique ; cette combinaison mercurielle ne donne plus d'acétaldéhyde. C'est ainsi qu'en présence d'acétate mercurique, l'acide malique, provenant de l'acide aspartique par désamination, ne donne plus qu'une quantité négligeable d'acétaldéhyde (tableaux IV, V et X).

Il est d'ailleurs remarquable que l'addition d'acétate mercurique bloque également la formation d'acétaldéhyde à partir de l'acide glycérique provenant de la désamination de la sérine. En revanche, des essais faits en partant de l'alanine, nous ont montré que l'acide lactique provenant de ce dernier acide aminé donnait quantitativement de l'acétaldéhyde aussi bien en présence qu'en absence d'acétate mercurique, quelle que soit d'ailleurs la concentration en SO_4Mn (2 ou 4 %) et la durée de l'oxydation (20 ou 70 minutes) (tableaux IV, V, VI, VII, VIII et IX) (1).

b) OBTENTION QUANTITATIVE D'ACÉTALDÉHYDE À PARTIR DE L'ENSEMBLE ALANINE+SÉRINE+ACIDE ASPARTIQUE.

Il ressort de la discussion précédente que pour obtenir un rendement suffisamment quantitatif en acétaldéhyde à partir de la sérine et de l'acide aspartique, il suffit d'augmenter la concentration en SO_4Mn (2 ou 4 %) et la durée de l'oxydation par le permanganate pendant 60 à 70 minutes.

c) DOSAGE DE L'ACÉTALDÉHYDE.

Nous avons vu l'importance du dosage de l'acétaldéhyde au moyen d'une réaction *spécifique* de cet aldéhyde. Notre choix s'est porté sur la réaction qu'il donne lorsque, même très dilué, on le traite par une solution de nitroprussiate en présence de pipérazine ; on sait que cette réaction provoque la formation d'une coloration bleu-violet ; cette réaction colorimétrique appelle plusieurs remarques :

1° Elle est suffisamment spécifique de l'acétaldéhyde ; en effet, parmi tous les aldéhydes autres que l'acétaldéhyde, seul le propionaldéhyde est susceptible de la donner ; mais la sensibilité de la réaction vis-à-vis de cet aldéhyde est trop faible pour gêner en quoi que ce soit le

(1) Il est évident que l'emploi d'acétate mercurique permet également le dosage de l'acide lactique et de l'acide malique en présence l'un de l'autre.

dosage de l'acétaldéhyde dans les conditions expérimentales réalisées ici ; en effet, les limites de la sensibilité de la réaction au nitroprussiate et à la pipérazine correspondent à des dilutions de 1/50.000 pour l'acétaldéhyde et de 1/1000 pour le propionaldéhyde.

2° La coloration bleue produite par la réaction en question présente l'inconvénient d'être fugace, évoluant assez rapidement en fonction du temps ; aussi les mesures colorimétriques nécessitent-elles quelques précautions : ayant fait choix d'une longueur d'onde convenable, bien définie (ici $\lambda=5600 \text{ \AA}$), on doit suivre quantitativement les variations, en fonction du temps, de son absorption (densité) par la solution colorée ; on obtient ainsi une courbe présentant un maximum, ce dernier apparaissant au bout de 2 à 3 minutes et se maintenant constant pendant environ 2 minutes. C'est cette valeur d'absorption maxima qui, traduite en densité, est comparée avec la courbe étalon construite à partir des chiffres du tableau I.

Les tableaux VI, VII et VIII montrent comment la spécificité du dosage colorimétrique de l'acétaldéhyde permet la détermination quantitative de l'alanine et de la somme sérine+acide aspartique dans des mélanges d'acides aminés.

TABLEAU IV

Influence de l'acétate mercurique sur la production d'acétaldéhyde à partir des hydroxyacides provenant de la désamination des différents acides aminés. L'oxydation par le permanganate dure 60 à 70 minutes et a lieu soit en présence, soit en absence d'acétate mercurique. Le volume de la solution à oxyder est de 50 cc. y compris la solution de SO_4Mn (10 cc.) et éventuellement de la solution d'acétate mercurique (5 cc.).

I = cc. d'iode 0,01 N correspondant aux aldéhydes devant théoriquement se former.

II et II' = cc. d'iode 0,01 N correspondant aux aldéhydes expérimentalement formés.

III et III' = Acides aminés calculés d'après II et II'.

IV et IV' = Rapport, en pour cent, de la quantité d'acides aminés trouvés expérimentalement à la quantité théorique.

Acides aminés traités en mg.	Sans $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$				Avec $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$		
	I	II	III	IV	II'	III'	IV'
Alanine							
6,6	14,8	14,4	6,4	97,0	14,1	6,3	95,0
6,6	14,8	14,7	6,5	99,0	14,0	6,2	94,0
Sérine							
6,6	12,6	11,3	5,9	90,0	0,4	0,2	3,2
6,6	12,6	11,4	6,0	91,0	0,6	0,3	4,8
Acide aspartique							
6,6	9,9	9,5	6,3	96,0	0,3	0,2	3,0
6,6	9,9	9,4	6,2	95,0	0,2	0,13	2,0
Glycocolle							
6,6	17,6	0,8	0,3	4,5	0,2	0,08	1,1
Cystéine							
6,6	10,9	1,1	0,67	10,0	0,3	0,18	2,7
Valine							
6,6	11,3	9,8	5,7	86,0	9,4	5,5	83,0
Leucine							
6,6	10,1	9,4	6,1	93,0	8,9	5,8	88,0
Phénylalanine							
6,6	8,0	3,0	2,5	37,0	1,8	1,5	22,0
Tryptophane							
6,6	6,6	0,7	0,7	11,0	0,3	0,3	4,5
Acide glutamique							
6,6	9,0	2,2	1,6	24,0	0,8	0,59	8,9
Lysine							
6,6	9,1	1,2	0,88	13,0	0,5	0,36	5,5
Arginine							
6,6	7,6	0,5	0,43	6,6	0,2	0,17	2,6
Histidine							
6,6	8,5	0,4	0,31	4,7	0,2	0,15	2,3
Proline							
6,6	11,5	1,0	0,57	8,7	0,6	0,34	5,2
Alanine							
6,6	14,8	1,3	0,58	8,1	0,4	0,18	2,7
6,6	14,8	1,5	0,66	10,0	—	—	—

TABLEAU V

Production d'acétaldéhyde à partir d'alanine, de sérine et d'acide aspartique en mélange deux à deux. Les réactions sont effectuées selon la technique décrite dans le texte.

I = cc. d'iode 0,01 N correspondant à la totalité de l'acétaldéhyde devant théoriquement se former.

I' = cc. d'iode 0,01 N correspondant à l'acétaldéhyde devant théoriquement se former à partir de l'alanine seule.

II et II' = cc. d'iode 0,01 N correspondant à l'acétaldéhyde expérimentalement formé.

Acides aminés traités en mg.	Sans $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$		II.100	Avec $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$		II'.100
	I	II	I	I'	II'	I'
Alanine + Ac. aspartique						
6,6 + 6,6	24,7	24,2	98,0	14,8	14,0	95,0
6,6 + 6,6	24,7	24,2	98,0	14,8	14,2	96,0
Alanine + Sérine						
6,6 + 6,6	27,4	26,1	95,0	14,8	13,9	94,0
6,6 + 6,6	27,4	26,2	96,0	14,8	14,1	95,0
						II'.100
						I
Ac. aspartique + Sérine						
6,6 + 6,6	22,5	20,5	91,0	0,0	0,6	2,7
6,6 + 6,6	22,5	20,3	90,0	0,0	0,5	2,2

TABLEAU VI

Dosage de l'alanine en présence d'un mélange d'acides aminés.

Ce mélange est constitué par des poids égaux des acides aminés suivants : glycolle, cystéine, sérine, valine et leucine.

Oxydation faite en 60 à 70 minutes en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$.

I = Alanine en mg.

II = Poids, en mg., du mélange des acides aminés.

III = cc. d'iode 0,01 N correspondant à l'acétaldéhyde fourni théoriquement par l'alanine.

IV = cc. d'iode 0,01 N correspondant aux aldéhydes expérimentalement formés.

V = alanine trouvée par colorimétrie, en mg.

VI = moyenne des résultats de la colonne V.

I	II	III	IV	V	VI	$\frac{\text{VI} \cdot 100}{\text{I}}$
0,0	20,0	0,0	12,26	0,0	—	—
5,0	20,0	11,2	22,8	4,48 4,56	4,5	90,0
10,0	20,0	22,5	31,8	9,45 9,94	9,7	97,0
15,0	20,0	33,7	43,2	14,22 14,40	14,3	95,0
20,0	20,0	45,0	52,0	19,35 19,50	19,4	97,0
15,0	25,0	33,7	45,9	13,08 14,10	13,6	91,0
10,0	30,0	22,5	37,2	9,30 9,48	9,4	94,0

TABLEAU VII

Dosage spécifique de l'alanine en présence d'un mélange d'acides aminés. Ce mélange est constitué par des poids égaux des acides aminés suivants : acide aspartique, acide glutamique, phénylalanine, arginine et tryptophane.

Oxydation faite en 60 à 70 minutes en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$.

I = Alanine en mg.

II = Poids en mg. du mélange des acides aminés.

III = cc. d'iode 0,01 N correspondant à l'acétaldéhyde fourni théoriquement par l'alanine.

IV = cc. d'iode 0,01 N correspondant aux aldéhydes expérimentalement formés.

V = Alanine trouvée par colorimétrie, en mg.

VI = moyenne des résultats de la colonne V.

I	II	III	IV	V	VI	$\frac{\text{VI} \cdot 100}{\text{I}}$
0,0	25,0	0,0	2,6	0,0 4,6	—	—
5,0	25,0	11,23	12,6	4,48 8,29	4,55	91,0
10,0	25,0	22,46	24,0	9,45 13,74	8,85	89,0
15,0	25,0	33,69	35,4	14,22 18,42	14,0	93,0
20,0	25,0	44,92	46,8	19,92 9,54	19,2	95,0
10,0	30,0	22,46	24,9	9,30 9,20	9,4	94,0
10,0	35,0	22,46	25,2	9,40	9,3	93,0

TABLEAU VIII

Dosage spécifique de l'alanine en présence d'un mélange d'acides aminés. Ce mélange est constitué par des poids égaux des acides aminés suivants : valine, sérine, lysine, proline et histidine.

Oxydation faite en 60 à 70 minutes en présence de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$.

I = Alanine en mg.

II = Poids en mg. du mélange des acides aminés.

III = cc. d'iode 0,01 N correspondant à l'acétaldéhyde fourni théoriquement par l'alanine.

IV = cc. d'iode 0,01 N correspondant aux aldéhydes expérimentalement formés.

V = Alanine trouvée par colorimétrie, en mg.

VI = moyenne des résultats de la colonne V.

I	II	III	IV	V	VI	$\frac{\text{VI} \cdot 100}{\text{I}}$
						I
0,0	25,0	0,0	7,2	0,0	—	—
				4,48		
5,0	25,0	11,2	15,0	4,79	4,65	93,0
				9,26		
10,0	25,0	22,5	25,8	9,69	9,5	95,0
				14,07		
15,0	25,0	33,7	36,6	13,65	13,85	92,0
				18,6		
20,0	25,0	45,0	45,9	18,6	18,6	93,0
				9,4		
10,0	35,0	22,5	27,0	9,7	9,55	95,0
				9,2		
10,0	35,0	22,5	28,5	9,2	9,2	92,0

TABLEAU IX

Dosage de l'alanine et de la somme sérine + acide aspartique dans différents mélanges de ces trois acides aminés.

Les réactions sont effectuées selon la technique décrite dans le texte.

I = Acétaldéhyde correspondant théoriquement à la totalité des acides aminés en mg.

II = Acétaldéhyde trouvé par colorimétrie, en mg.

I' = Acétaldéhyde correspondant théoriquement à l'alanine, en mg.

II' = Acétaldéhyde trouvé par colorimétrie, en mg.

Alanine en mg.	Sérine en mg.	Ac. aspar- tique en mg.	Sans $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$		II.100	Avec $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$		II'.100
			I	II		I'	II'	
15,0	15,0	0,0	13,70	13,00	95,0	7,42	7,20	97,0
15,0	15,0	15,0	18,67	18,00	96,0	7,42	7,45	100,0
10,0	15,0	15,0	16,20	15,20	94,0	4,95	4,62	93,0
20,0	15,0	15,0	21,15	20,40	96,0	9,90	9,37	95,0

TABLEAU X

Influence de l'acétate mercurique sur la production d'acétaldéhyde à partir de l'acide malique.

Une quantité donnée d'acide malique est traitée dans les conditions indiquées dans le texte par MnO_4K en présence de SO_4Mn pendant 60 à 70 minutes. L'acétaldéhyde formé est dosé colorimétriquement.

Ac. malique en mg.	Acétal- déhyde théorique mg.	Sans $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$		Avec $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$	
		Acétaldéhyde trouvé (mg.)	%	Acétaldéhyde trouvé (mg.)	%
5,0	1,64	1,58	96,0	0,0	0,0
7,5	2,46	2,36	96,0	0,0	0,0

Application à l'étude de quelques protéines

Il n'est pas sans intérêt de signaler ici que la méthode de dosage que nous avons ainsi mise au point, et qui vient d'être discutée, a été appliquée, au laboratoire, par P. Desnuelle [8] à l'étude de la teneur en alanine, en sérine et en acide aspartique, de quelques protéines : édénine, caséine, protéine du ferment jaune. Cette étude a d'ailleurs conduit Desnuelle à apporter quelques modifications à la méthode en question, modifications que nous croyons utiles de rapporter ici.

1. — DOSAGE STUFOPHOTOMÉTRIQUE DE L'ACÉTALDÉHYDE. — OBTENTION D'UNE COURBE DE RÉFÉRENCE.

La généralisation de l'emploi du stuphotomètre de Pulfrich rendait l'utilisation de cet appareil particulièrement intéressante ici. Voici comment l'on opère le dosage stufo-photométrique de l'acétaldéhyde :

On prépare une solution d'acétaldéhyde en oxydant au permanganate une solution d'acide lactique. On fait barboter les vapeurs qui prennent naissance dans du bisulfite de sodium. Après destruction de l'excès de bisulfite par l'iode, l'acétaldéhyde est mis en liberté par addition de bicarbonate de sodium. On titre alors exactement par l'iode N/100. La liqueur ainsi obtenue est diluée à un volume connu. Soit L cette solution. On mélange dans un tube à essai α cc. de L contenant entre 200 et 700 γ d'acétaldéhyde, (6 — α) cc. d'une solution contenant, et dans les mêmes proportions, tout ce que contient la solution L, sauf l'acétaldéhyde, 1,5 cc. d'une solution saturée de pipérazine hydratée et 0,5 d'une solution fraîche de nitroprussiate de sodium à 4 %. Le volume final est ainsi de 8 cc. Après agitation, le liquide est placé dans la cuvette convenable de l'appareil de Pulfrich.

Soient :

d l'épaisseur de la cuvette en cm.

D l'absorption en % correspondant au filtre (S 57) utilisé ici. Cette valeur est obtenue en faisant la moyenne de six lectures, trois faites sur le tambour de droite de l'appareil et trois faites sur le tambour de gauche. Ces six lectures sont effectuées au cours de la période de deux à trois minutes pendant laquelle l'intensité de la coloration reste constante.

k le chiffre correspondant à D dans la table livrée avec l'appareil.

Les éléments de la courbe $\gamma=f(k)$ sont donnés par le tableau XI.

TABLEAU XI

Acétaldéhyde en γ	d	D	k
124	1,0	39,2	0,408
186	0,5	46,7	0,330
248	0,5	34,9	0,457
310	0,5	26,0	0,585
372	0,5	19,5	0,710

La courbe tracée à partir de ces chiffres est très sensiblement une droite. L'interpolation entre deux valeurs est donc parfaitement justifiée.

2. — DOSAGE DE L'ALANINE ET DE LA SÉRINE+ACIDE ASPARTIQUE DANS 200 MG. DE PROTÉINE.

A. — Description de la méthode.

a) *Hydrolyse*. — 200 mg. de protéine environ sont hydratés 36 heures avec 2 à 3 cc. d'acide sulfurique 6 N. L'hydrolysate est dilué à 200 cc. et l'acide sulfurique quantitativement précipité par de la baryte fraîchement recristallisée. Le sulfate de baryum séparé par centrifugation est lavé 5 fois à l'eau bouillante. Les eaux-mères et de

lavage sont réunies et évaporées sous vide jusqu'à 50 cc. Quelques dixièmes de centimètre cube sont prélevés pour un dosage d'azote (microkjeldahl) et le reste est soumis à la désamination.

b) *Désamination.* — On dilue à 200 cc. avec de l'eau et on ajoute 10 cc. d'acide sulfurique 2 N. On chauffe au bain-marie bouillant puis on laisse tomber goutte à goutte, pendant une demi-heure, et en agitant bien, 25 cc. d'une solution à 5 % de nitrite de sodium. On laisse ensuite 1/4 d'heure au bain-marie. Pendant ce temps la réaction de désamination se termine et une partie de l'acide nitreux en excès se décompose. On ajoute alors, goutte à goutte, et pendant 15 minutes, 7,5 cc. d'une solution d'urée à 30 % qui détruit l'acide nitreux en excès. L'addition d'une plus forte quantité d'urée est inutile et nuirait même au moment de l'oxydation permanganique. La liqueur est alors évaporée sous vide jusqu'à 100 cc.

c) *Oxydation permanganique.* — Le dosage spécifique de l'alanine et de la somme sérine+acide aspartique se fait conformément aux indications données précédemment. Toutefois l'addition de quantités légèrement plus fortes d'acétate mercurique s'est révélée nécessaire : il faut ici 2 cc. d'acétate mercurique à 5 % par 10 cc. de liquide à oxyder, soit deux fois plus que dans la méthode originale.

d) *Dosage colorimétrique.* — Il est effectué selon la technique utilisée pour l'obtention de la courbe de référence.

B. — *Justification de cette méthode.*

a) *Dosage d'une quantité connue d'alanine.* — 200 mg. d'alanine sont dissous dans 200 cc. d'eau et désaminés. On amène le volume à 100 cc.; 5 cc. de cette solution sont oxydés par le permanganate de potassium en présence d'acétate mercurique. Volume de la solution aldéhydique: 100 cc.

a = 6 cc.
k = 0,553

d = 0,5
soit

D = 29,3
288 γ -acétaldéhyde

Quantité d'alanine retrouvée :

$$\frac{0,288 \cdot 89 \cdot 100 \cdot 100}{44 \cdot 5 \cdot 6} = 193 \text{ mg. ou } 96 \% \text{ de la quantité initiale.}$$

b) *Dosage de l'alanine et de la somme sérine + acide aspartique dans l'édestine (Hoffmann-La Roche).* — Quantité de protéine hydrolysée (microkjeldahl) : 1,55 g. calculée en prenant N = 18,7 %).

Volume total : 500 cc.

a) Désamination : prise d'essai : 75 cc. (232 mg. de protéine) ; volume final : 100 cc.

b) Oxydation permanganique :

α) dosage de l'alanine.

Prise d'essai : 40 cc., qui sont additionnés de 10 cc. de SO_4Mn à 10 %, 5 cc. de PO_4H_3 2 M, et 11 cc. de $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Hg}$ à 5 %. Ebullition 50 minutes. Volume de la solution aldéhydique : 75 cc.

a = 6 cc.
k = 0,367

d = 0,5
soit

D = 43,0
205 γ -acétaldéhyde

Acétaldéhyde total dans les 500 cc. initiaux :

$$\frac{0,205 \cdot 75 \cdot 100 \cdot 500}{6 \cdot 40 \cdot 75} = 42,6 \text{ mg.}$$

Quantité d'alanine correspondante : 86 mg. ou 5,55 %.

β) Dosage de la somme sérine + acide aspartique.

Prise d'essai : 20 cc. qui sont additionnés de 20 cc. de SO_4Mn 10 % et de 5 cc. de PO_4H_3 2 M. Ebullition 65 minutes. Volume de la solution aldéhydique : 75 cc.

a = 6 cc.
k = 0,448

d = 0,5
soit

D = 35,7
245 γ -acétaldéhyde

Acétaldéhyde total dans les 500 cc. initiaux :

$$\frac{0.245 \cdot 75 \cdot 100 \cdot 500}{6 \cdot 20 \cdot 75} = 102,0 \text{ mg.}$$

La somme sérine + acide aspartique correspond donc à :
 $102,0 - 42,6 = 59,4 \text{ mg. acétaldéhyde.}$

Les teneurs de l'édestine en alanine, sérine et acide aspartique telles qu'elles sont admises actuellement, sont respectivement de 3,6 %, 0,33 % et 10,4 %.

Les chiffres concernant l'alanine et la sérine ont été obtenus par E. Abderhalden [9]. Cet auteur estérifie les acides aminés provenant de l'hydrolyse acide de la protéine et soumet les esters à la distillation fractionnée. Il obtient ainsi quatre fractions qu'il saponifie. L'alanine est ensuite séparée par cristallisation fractionnée et la sérine par l'intermédiaire de son dérivé β -naphtalène-sulfonylé. Or ces manipulations sont toujours, même si l'on opère sur de grosses masses, accompagnées de fortes pertes dues à des réactions secondaires.

Il n'est donc pas étonnant, comme le fait remarquer Desnuelle, que la valeur de 3,6 % indiquée par Abderhalden pour l'alanine soit sensiblement inférieure à celle obtenue par la méthode actuelle ; et étant donnée la spécificité de cette méthode, il apparaît que c'est cette dernière valeur qui doit être considérée comme exacte.

D'autre part, le chiffre de 0,33 % pour la sérine est probablement entaché d'une erreur encore plus considérable du fait que l'obtention du dérivé β -naphtalène-sulfonylé d'un acide aminé est loin d'être une opération quantitative. Si l'on prend le chiffre sensiblement double de 0,7 % comme expression de la véritable teneur de l'édestine en sérine, on peut déduire du dosage colorimétrique précédemment indiqué une teneur en acide aspartique de 10,6 %. Cette valeur est en parfait accord avec celle de 10,4 % indiquée par D. B. Jones et O. Møller [10]. Ces auteurs précipitent l'aspartate de baryum par l'alcool et isolent ensuite cet acide par son sel de cuivre. Cette tech-

nique est susceptible de donner des résultats quantitatifs, et la valeur ainsi obtenue doit être considérée comme correcte.

Ces considérations permettent de conclure que si le dosage colorimétrique de l'alanine et de la somme sérine + acide aspartique dans l'édestine donne des résultats plus forts que ceux fournis par les techniques d'isolement, les divergences observées ne sont pas telles qu'on ne puisse raisonnablement les attribuer au manque d'exactitude de ces dernières.

c) *Dosage de l'alanine et de la somme sérine + acide aspartique dans la caséine d'après Hammarsten.*

Quantité de protéine hydrolysée (microkjeldahl) : 1,40 g. (calculée en prenant N = 15,7 %).

Volume total : 250 cc.

Désamination : prise d'essai : 35 cc. (196,5 mg. de protéine) ; volume final : 100 cc.

Oxydation permanganique :

a) *dosage de l'alanine.*

Prise d'essai : 65 cc. qui sont additionnés de 10 cc. de SO_4Mn à 10 %, 5 cc. de PO_4H_3 2 M, et de 15 cc. de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$ à 5 %. Ebullition 50 min. Volume de la solution aldéhydique : 75 cc.

a = 6 cc.

d = 1

D = 35,2

k = 0,454

soit

137 γ -acétaldéhyde

Acétaldéhyde total dans les 250 cc. initiaux :

$$\frac{0,137 \cdot 75 \cdot 100 \cdot 250}{6 \cdot 65 \cdot 35} = 18,8 \text{ mg.}$$

Quantité d'alanine correspondante : 38,1 mg. = 2,7 %.

β) *Dosage de la somme sérine + acide aspartique.*

Prise d'essai : 35 cc. qui sont additionnés de 20 cc. de

meaux, est séparé par centrifugation du liquide jaune fluorescent contenant l'acide lactoflavinephosphorique. Sans être séchée, cette protéine est hydrolysée 36 heures avec 3 cc. d'acide sulfurique 6 N.

On effectue deux dosages parallèles sur chaque fois 198,1 mg. (cette valeur est déterminée par microkjeldahl en prenant le pourcentage d'azote du ferment égal à 16,8).

Volume total : 200 cc.

Désamination : prise d'essai : 200 cc. ramenés après désamination à 100 cc.

Oxydation permanganique :

α) Dosage de l'alanine.

Prise d'essai : 45 cc. qui sont additionnés de 10 cc. de SO_4Mn 10 %, 5 cc. de PO_4H_3 2 M et de 12 cc. de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$ 5 %. Ebullition 50 min. Volume de la solution aldéhydique : 75 cc.

$a = 6$ cc.

$d = 0,5$

$D_1 = 29,2$

$D_2 = 28,8$

$k_1 = 0,535$

soit

287 γ -acétaldéhyde

$k_2 = 0,541$

soit

290 γ -acétaldéhyde

Acétaldéhyde total dans les 200 cc. initiaux :

$$1) \quad \frac{0,287 \cdot 75 \cdot 100}{6 \cdot 45} = 7,97 \text{ mg.}$$

$$2) \quad \frac{0,290 \cdot 75 \cdot 100}{6 \cdot 45} = 8,08 \text{ mg.}$$

Quantités d'alanine correspondantes : 16,15 mg. et 16,42 mg.

Moyenne : 16,28 mg., soit 8,2 %.

β) Dosage de la somme sérine + acide aspartique.

Prise d'essai : 30 cc. qui sont additionnés de 20 cc. de SO_4Mn 10 % et de 5 cc. de PO_4H_3 2 M. Ebullition 65 min. Volume de la solution aldéhydique : 75 cc.

a = 6 cc.	d = 0,5	D ₁ = 31,5 D ₂ = 30,4
k ₁ = 0,501	soit	270 γ-acétaldéhyde
k ₂ = 0,518	soit	279 γ-acétaldéhyde

Acétaldéhyde total dans les 200 cc. initiaux : 11,25 mg. et 11,62 mg. Moyenne : 11,43 mg.

La somme (sérine + acide aspartique) correspond à 11,43 — 8,03 = 3,4 mg. d'aldéhyde.

Kuhn et Desnuelle [12, 13], partant d'environ 1 g. de ferment, ont isolé 1,9 % d'acide aspartique. Ce chiffre ne représente qu'une valeur limite inférieure de la teneur véritable du ferment en cet acide. Si, comme il est probable, cette teneur est de l'ordre de 3 %, le dosage précédent permet de calculer, en première approximation, un pourcentage de sérine égal à 1,7 %.

Dans une molécule de ferment jaune (P. M. = 70.000), il y aurait donc 65 molécules d'alanine et environ 11 molécules de sérine et 16 d'acide aspartique. Grâce à ces résultats, joints à ceux déjà obtenus par Kuhn et Desnuelle, 76 % de l'azote protéique du ferment jaune se trouvent ainsi caractérisés.

Essais de séparation quantitative de l'acide aspartique à partir d'un mélange contenant, outre cet acide, de l'alanine et de la sérine

On dissout dans un volume d'eau suffisant :

- 102,0 mg. alanine,
- 105,2 mg. sérine,
- 103,4 mg. acide aspartique,
- 100 mg. glycolle,
- 100 mg. nitrate d'arginine,
- 100 mg. acide glutamique,
- 100 mg. tyrosine.

Les acides aminés dicarboxyliques sont séparés sous forme de leur sel de baryum suivant la technique de D. B. Jones et O. Moeller [4]. Après élimination du baryum par l'acide sulfurique, on obtient deux liqueurs, L₁ et L₂. L₁ provient des sels de baryum solubles dans l'alcool et doit contenir l'alanine et la sérine ; L₂ provient des sels de baryum insolubles dans l'alcool et doit contenir ainsi l'acide aspartique.

Après désamination, les liqueurs L₁ et L₂ sont oxydées au permanganate en présence et en l'absence d'acétate mercurique.

Les quantités d'acétaldéhyde obtenues dans chaque cas sont les suivantes :

L₁ avec acétate mercurique .. 47,5 mg.
L₁ sans acétate mercurique .. 86,6 mg.

Différence 39,1 mg.

L₂ avec acétate mercurique .. traces indosables
L₂ sans acétate mercurique .. 33,1 mg.

Les valeurs finales correspondant respectivement à l'alanine, à la sérine et l'acide aspartique, sont données dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

Acides aminés	Calculés	Retrouvés	
	en mg.	en mg.	%
Alanine	102,0	96,0	94,0
Sérine	105,2	93,2	88,6
Acide aspartique	103,4	100,1	96,5

Ces résultats montrent que les trois acides aminés, alanine, sérine et acide aspartique, peuvent être dosés séparément dans une protéine en combinant les méthodes de Jones et Moeller avec celles que nous avons mises au point, dès que l'on possède de 2 à 5 g. de cette protéine.

DEUXIEME PARTIE

METHODE DE DOSAGE SPECIFIQUE DE LA VALINE ET DE LA LEUCINE DANS UN MELANGE D'ACIDES AMINES QUELCONQUES

La valine et la leucine appartiennent à ce groupe d'acides monoaminés monocarboxyliques que l'absence de groupements caractéristiques dans leurs molécules empêchait jusqu'ici de pouvoir être soit caractérisés qualitativement par une réaction spécifique, soit dosés en présence d'autres acides aminés ; la seule méthode de détermination quantitative de ces acides était basée sur leur isolement, après transformation en esters éthyliques, par distillation fractionnée de ces esters selon la technique classique de E. Fischer* ; or, on sait les inconvénients de cette technique qui nécessite de grosses quantités de matière première et qui est souvent accompagnée de pertes importantes.

Il nous a paru ainsi intéressant, et ce, particulièrement en vue de recherches ultérieures sur la synthèse fermentaire de la valine et de la leucine, d'établir une méthode de dosage commode et suffisamment précise de ces acides aminés, permettant d'opérer sur de petites quantités de

(1) Virtanen et Laine (14) ont bien indiqué que l'on pouvait doser spécifiquement la leucine par l'intermédiaire de l'aldéhyde isovalérique produit par action de la ninhydrine sur la leucine ; mais nous n'avons pu jusqu'ici avoir connaissance d'aucune technique précise ni de résultats expérimentaux concernant ce mode de dosage.

matière première. Dans le présent travail, nous décrivons les méthodes que nous avons mises au point pour le dosage de la valine et de la leucine dans les trois cas suivants :

1° Dosage spécifique de la valine dans un mélange d'acides aminés quelconques, — mais en l'absence de leucine.

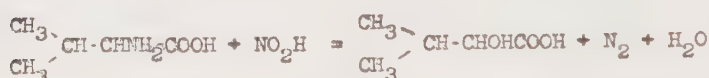
2° Dosage spécifique de la leucine dans un mélange d'acides aminés quelconques, — mais en l'absence de valine.

3° Dosages spécifiques de la valine et de la leucine, ces deux acides aminés existant simultanément dans un mélange d'acides aminés quelconques.

I. — Dosage de la valine dans un mélange d'acides aminés quelconques, mais en l'absence de leucine

1° PRINCIPE DE LA MÉTHODE ; RÉACTIONS MISES EN JEU

a) Transformation quantitative de l'acide aminé en acide hydroxy correspondant, par action de l'acide nitreux :

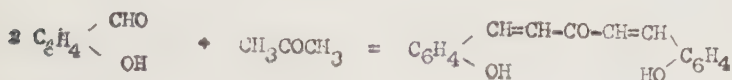


b) Oxydation de l'acide α -oxy-isovalérienique ainsi obtenu, avec formation d'acétone, par action de l'acide chromique en solution acétique ; cette oxydation est effectuée dans des conditions telles que la quantité d'acétone produite soit rigoureusement proportionnelle à la quantité de valine traitée :



c) Séparation quantitative de l'acétone par distillation.

d) Dosage colorimétrique de l'acétone recueillie, dosage basé sur la réaction que donne l'acétone avec l'aldéhyde salicylique en milieu fortement alcalin (réaction de Fabinyl [15] :



2° DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

a) *Transformation des acides aminés en les oxy-acides correspondantes.*

Cette réaction est faite selon la méthode de Kendall et Friedmann [2], en opérant comme il a été dit dans la première partie de ce travail.

Quand l'opération est terminée, on enlève le flacon du bain-marie, on transvase son contenu, quantitativement, dans un ballon à distiller sous vide, et on concentre le liquide jusqu'à un volume sensiblement inférieur à 20 cc.

b) *Oxydation des oxy-acides par l'acide chromique (oxydation sous pression).*

On utilise ici un ballon Pyrex de 150 cc., à col long, muni d'un système de fermeture hermétique, et capable de s'adapter au réfrigérant qui permettra ultérieurement la séparation de l'acétone formée. La solution obtenue comme il vient d'être dit est introduite dans ce ballon ; son volume, y compris les eaux de rinçage, doit être très voisin de 20 cc. On ajoute alors à 4 cc. d'acide acétique pur glacial, et un volume d'une solution d'acide chromique pur à 10 %, variant de 4 à 5 cc., selon la quantité des acides aminés traités. On bouche ensuite hermétiquement le ballon et on l'agite énergiquement ; on observe immédiatement une réduction de l'acide chromique accompa-

gnée d'un dégagement gazeux provenant de l'urée qui subsistait dans le milieu. Le ballon est alors placé au bain-marie bouillant pendant 3 heures ; au bout de ce temps, on l'enlève et le refroidit, d'abord sous un courant d'eau froide, puis dans un mélange réfrigérant (glace et sel marin).

c) *Séparation quantitative de l'acétone par distillation.*

Le ballon, dont le contenu est ainsi suffisamment froid, est alors ouvert avec précautions (légère surpression), puis rapidement adapté à un réfrigérant descendant (longueur 20 cm.) dont l'extrémité inférieure plonge jusqu'au fond d'un ballon récepteur à fond plat de 150 cc. contenant de 8 à 10 cc. d'eau distillée, et maintenu lui-même dans un mélange réfrigérant. On distille le contenu du ballon où a eu lieu l'oxydation, à une vitesse telle que les deux tiers du volume total soient passés dans le ballon récepteur en 15 minutes. On arrête alors la distillation, rince soigneusement l'extrémité inférieure du réfrigérant, neutralise le distillat (riche en acide acétique entraîné au cours de la distillation) par KOH en présence de papier de tournesol et, finalement, on transvase, quantitativement, le liquide ainsi neutralisé dans un ballon jaugé convenable (50, 75 ou 100 cc.).

d) *Dosage colorimétrique de l'acétone formée.*

Nous utilisons ici une variante de la méthode indiquée par Urbach [16].

On prélève 2 cc. du distillat neutre, que l'on place dans un tube à essais, et auxquels on ajoute successivement 2 cc. d'une solution de KOH 11.3 N (cette concentration est vérifiée par titrage), et 1 cc. d'une solution alcoolique d'aldéhyde salicylique, préparée en dissolvant 10 cc. d'aldéhyde salicylique pur Merck dans 142 cc. d'alcool à 95° (soit une solution à 10 % en poids d'aldéhyde salicylique

dans l'alcool à 95°). D'autre part, on prépare une solution témoin en ajoutant les mêmes réactifs à 2 cc. d'eau distillée, contenus dans un second tube, qui sera traité comme le précédent. On bouche les tubes, les agite soigneusement, puis on les place au bain-marie à 50° où on les maintient pendant une heure, en ayant soin d'agiter de temps en temps. Au bout de ce temps, on refroidit les tubes en les plongeant 5 minutes dans l'eau glacée, puis on introduit dans chacun d'eux 10 cc. d'eau distillée, de telle sorte que le volume final des solutions qu'ils contiennent soit exactement de 15 cc. Le dosage colorimétrique est fait à l'acide du spectrophotomètre de Pulfrich, utilisé avec le filtre S 53; les cuves, de 2 cm. d'épaisseur, contiennent l'une la solution correspondant au distillat acétonique, et l'autre la solution témoin; il est recommandable de faire, comme d'habitude, trois lectures successives, d'intervertir les cuves, puis de faire trois autres lectures successives, et de prendre la moyenne D des six lectures. La table fournie avec l'appareil permet de déterminer, à partir de D, l'intensité K de l'absorption correspondant à la coloration donnée par l'acétone; on déduit facilement la concentration en acétone, en portant cette valeur de K sur la courbe de référence que l'on a établie une fois pour toutes, courbe représentant les valeurs de K en fonction de la concentration en acétone. Il suffit alors

de multiplier la quantité d'acétone trouvée par $\frac{1}{u} \cdot \frac{117}{58}$

soit $\frac{2,02}{u}$ pour obtenir la quantité de valine cherchée. Or,

traitée comme il vient d'être dit, la valine donne naissance, comme on le verra plus loin, à 65 % de la quantité théorique d'acétone; on a donc ici $u = 0,65$.

OBTENTION DES COURBES DE RÉFÉRENCE

A. — *Dosage colorimétrique de l'acétone.* — On prépare une solution aqueuse d'acétone diluée à partir d'acétone pure fraîchement distillée ; la teneur exacte de cette solution en acétone est déterminée par dosage iodométrique, selon la technique classique de Messinger. On prélève un volume de cette solution tel qu'il renferme une quantité d'acétone bien déterminée, voisine de 4 mg., et on dilue à 100 cc., de façon précise, dans un ballon jaugé. Toutes ces opérations se font à froid et avec les précautions nécessaires pour éviter toute perte en acétone. Un cc. de cette solution diluée correspond ainsi environ à 40 γ. d'acétone, concentration qui est voisine de celles auxquelles l'on a à faire au cours des dosages. On dispose, d'autre part, d'une série de tubes à essais dans lesquels on introduit les quantités de solution acétonique et d'eau distillée indiquées dans le tableau I. on y ajoute 2 cc. de la solution alcoolique d'aldéhyde salicylique à 10 % ; on opère ensuite exactement comme il a été dit à propos du dosage proprement dit, en effectuant les mesures au moyen du spectrophotomètre de Pulfrich ; les chiffres du tableau ci-dessous correspondent, comme dans le dosage lui-même, à l'emploi du filtre S 53, et d'une cuve de 2 cm. d'épaisseur.

TABLEAU I

Désignation des tubes	Solution d'acétone en cc.	H ₂ O cc.	Acétone en γ	D	K
Témoin	0,0	2,0	0	—	—
1	0,2	1,8	7,8	77,0	0,057
2	0,4	1,6	15,6	62,0	0,104
3	0,6	1,4	23,4	46,0	0,158
4	0,8	1,2	31,2	41,0	0,194
5	1,0	1,0	39,0	30,0	0,262
6	1,2	0,8	46,8	23,5	0,315
7	1,4	0,6	54,6	19,0	0,360
8	1,6	0,4	62,4	14,5	0,420
9	1,8	0,2	70,2	11,6	0,468
10	2,0	0,0	78,0	9,4	0,514

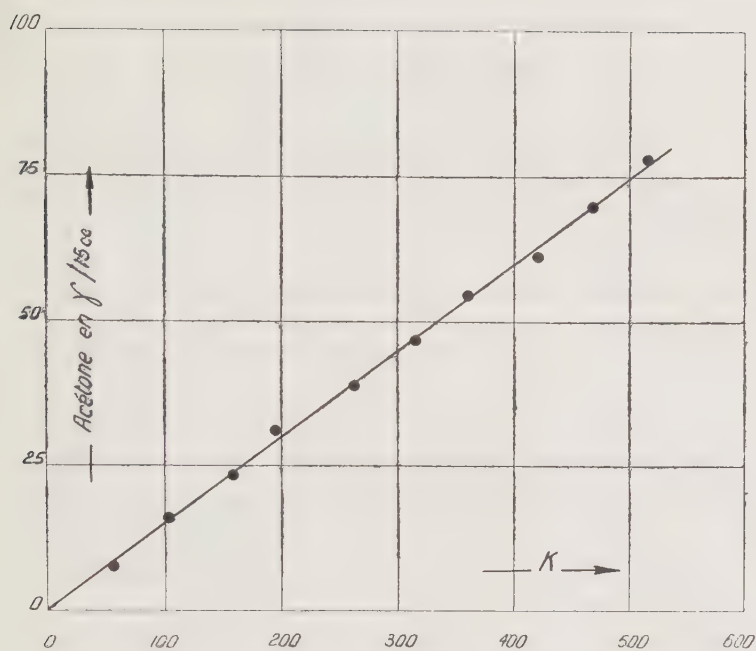


FIG. 1

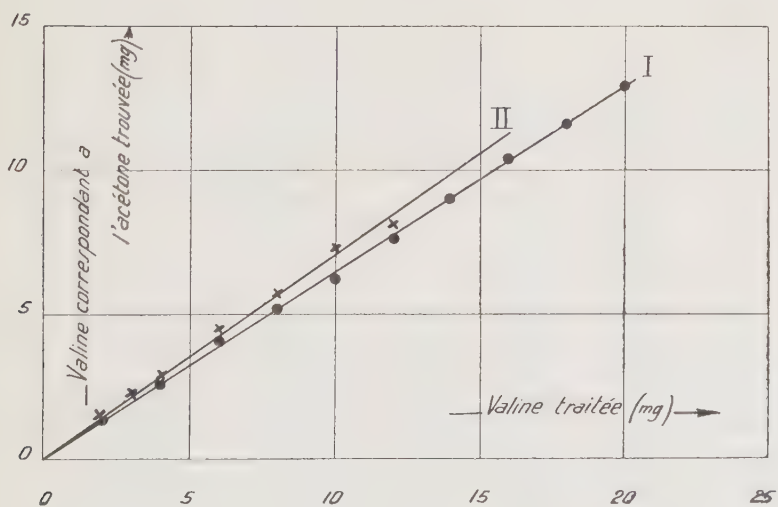


FIG. 2

Les chiffres du tableau I permettent de construire la courbe représentant l'intensité de l'absorption lumineuse K pour le filtre utilisé, en fonction de la quantité d'acétone. Cette courbe est très sensiblement une droite (fig. 1).

B. — *Détermination de la quantité d'acétone produite au cours du traitement de la valine ; mesure de u.* — Nous exprimons le rendement en acétone produite à partir de la valine traitée comme il vient d'être dit par

$$u = \frac{\text{acétone produite}}{\text{acétone théorique}}. \text{ Pour déterminer la valeur de } u$$

en fonction de la quantité de valine mise en jeu, on applique les opérations précédentes (désamination, oxydation, etc.) à une série d'essais renfermant de 0 à 20 mg. de valine pure, et on mesure les quantités d'acétone formée. Le tableau II donne les résultats obtenus, résultats à partir desquels est tracée la courbe de référence (courbe I, fig. 2) permettant le dosage de la valine. Cette courbe se présente sous l'aspect d'une droite rigoureuse ; on voit ainsi que u est une constante, égale ici à 0,65.

TABLEAU II

Valine traitée (mg.)	Acétone théorique (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	$u \times 100$	Observations	
				Volume du distillat acétonique (cc.)	Volume prélevé pour la colorimétrie (cc)
0	0	0	70	50	2
2	0,99	0,694	70	75	2
4	1,98	1,28	65	50	2
6	2,97	2,00	67	100	2
8	3,96	2,57	65	100	2
10	4,95	3,12	63	100	2
12	5,94	3,80	64	100	1,5
14	6,93	4,42	64	100	1,5
16	7,92	5,15	65	100	1
18	8,91	5,77	65	100	1
20	9,90	6,43	65	100	1

3° DISCUSSION DE LA MÉTHODE

a) *Nécessité de la transformation des acides aminés en oxy-acides, préalablement à l'oxydation par l'acide chromique.*

La nécessité de la désamination préalable de la valine pour sa transformation ultérieure en acétone par oxydation, ressort des chiffres du tableau III, chiffres qui correspondent aux conditions expérimentales suivantes : 10 mg. de valine sont dissous dans 20 cc. d'eau distillée, on ajoute 4 cc. de la solution d'acide chromique à 10 % et 4 cc. d'acide acétique pur, puis on porte au bain-marie bouillant ; le produit de la distillation du mélange oxydant est ensuite neutralisé par KOH et amené à un volume convenable.

TABLEAU III

Durée de l'oxydation (heures)	Valine retrouvée par colorimétrie (mg.)	% de la quantité théorique	Observations	
			Volume du distillat acétonique (cc.)	Volume prélevé pour la colorimétrie (cc.)
2	0,487	5	50	2
4	0,975	10	75	2

b) *Influence de la durée de l'oxydation sur la quantité d'acétone formée à partir de l'acide α -oxy-isovalérianique.*

Pour déterminer le temps nécessaire à l'obtention de la quantité maxima d'acétone à partir de la valine, nous avons effectué cette oxydation sur l'oxy-acide provenant de la désamination de 20 mg. de valine, pendant des temps compris entre 1 heure et 5 heures. La concentration des réactifs employés est la même que celle indiquée précédemment. Il ressort des chiffres du tableau IV que la quantité maxima d'acétone est obtenue après 3 heures d'oxydation, une oxydation plus longue ne changeant rien au rendement.

TABLEAU IV

Durée de l'oxydation (heures)	Acétone trouvée (mg.)	Valine trouvée (mg.)	% de la quantité théorique
1	6,05	12,2	61
2	6,28	12,7	64
3	6,43	13,0	65
4	6,43	13,0	65
5	6,28	12,7	64

*c) Influence de la présence d'autres acides aminés ;
spécificité de la méthode.*

La démonstration du fait que seule la valine (en dehors de la leucine) donne naissance à de l'acétone dans les conditions décrites plus haut, repose sur une série d'expériences dans lesquelles nous avons dosé la valine en présence d'autres acides aminés. Les résultats de ces dosages sont donnés dans les tableaux V et VI.

TABLEAU V

Dosage spécifique de la valine en présence d'un mélange d'acides aminés.

Le mélange est constitué par 9 mg. de chacun des acides aminés suivants : sérine, acide aspartique, glycocolle et cystéine. Durée de l'oxydation : 3 heures.

Valine présente (mg.)	Acétone théorique correspondant à la valine (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	Valine trouvée (mg.)	% de la quantité théorique
0	0	0	0	—
1	0,445	0,340	1,06	106
2	0,99	0,662	2,05	102
3	1,435	1,00	3,12	104
4	1,98	1,26	3,92	98
6	2,97	2,03	6,25	104
8	3,96	2,55	8,1	101
10	4,95	3,27	10,15	102
12	5,94	3,85	11,9	99

TABLEAU VI

Dosage de la valine en présence d'un mélange d'acides aminés.

Le mélange est constitué par 9 mg. de chacun des acides aminés suivants : isoleucine, acide glutamique, tyrosine, tryptophane. Durée de l'oxydation : 4 heures.

Valine présente (mg.)	Acétone théorique correspondant à la valine (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	Valine trouvée (mg.)	% de la quantité théorique
0	0	0	0	—
1	0,445	0,350	1,08	108
2	0,99	0,650	2,02	101
3	1,435	0,922	2,86	96
4	1,98	1,267	3,93	98
6	2,97	2,00	6,25	104
8	3,96	2,535	7,86	98
10	4,95	3,120	9,7	97
12	5,94	3,77	11,7	97

En outre, nous avons constaté qu'aucun des acides aminés suivants, traité isolément, à raison de 20 mg. chacun, ne donne naissance à une quantité décelable d'acétone : glycocolle, alanine, sérine, cystéine, isoleucine, acide aspartique, acide glutamique, tyrosine, tryptophane, proline, arginine et lysine.

Le cas de l'isoleucine est particulièrement intéressant : on eût pu croire en effet que la méthyléthylcétone qui se forme vraisemblablement lors de l'oxydation chromique de l'acide méthyléthyllactique résultant lui-même de la désamination de l'isoleucine eût réagi comme l'acétone. En réalité, il n'en est rien, ce qui s'explique par la sensibilité beaucoup moins grande de la réaction de Fabinyi vis-à-vis de la méthyléthylcétone, dont la présence ne peut ainsi gêner en quoi que ce soit le dosage de l'acétone dans les conditions expérimentales réalisées ici ; nous avons constaté, en effet, que les limites de sensibilité de la réaction de Fabinyi correspondent à des dilutions de 8/15 cc.

pour l'acétone et de 400 γ /15 cc. pour la méthyléthylcétone, soit une sensibilité 50 fois plus faible pour ce dernier corps que pour l'acétone*.

d) *Dosage de l'acétone.*

Le mode opératoire que nous utilisons pour le dosage de l'acétone appelle la remarque suivante : c'est à Urbach [4] que l'on doit l'utilisation de la réaction de Farbinyi pour le dosage colorimétrique de l'acétone par le spectrophotomètre de Pulfrich ; nous avons constaté toutefois que les indications expérimentales de cet auteur ne correspondent pas aux conditions optima de la réaction. D'après Urbach, en effet, l'intensité maxima de coloration s'obtient en chauffant les tubes contenant la solution acétonique, l'aldéhyde salicylique et la potasse, au bain-marie à 50° pendant 20 minutes ; or, les expériences que nous avons faites montrent que l'obtention de l'intensité maxima de coloration nécessite un chauffage à 50° pendant une heure (tableau VII).

TABLEAU VII

La quantité d'acétone est quelconque.

Filtre : S 53. Epaisseur de la cuve : 2 cm.

Temps de chauffage en minutes	20	40	60	80
D	28	19	17	17

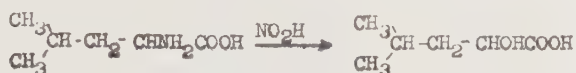
(*) C'est également une question de sensibilité qui fait que la petite quantités d'aldéhydes formés au cours du traitement d'acides aminés autres que la valine et la leucine, ne gêne pas le dosage de l'acétone ; l'acétaldéhyde, par exemple, ne manifeste ici sa présence que lorsqu'il se trouve à une concentration supérieure à 600 γ /15 cc.

II. — Dosage de la leucine dans un mélange d'acides aminés quelconques, mais en l'absence de valine

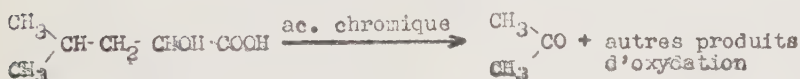
1° PRINCIPE DE LA MÉTHODE ; RÉACTIONS MISES EN JEU

Le dosage de la leucine est basé sur les mêmes réactions que celui de la valine, à savoir :

a) *Transformation quantitative de l'acide aminé en l'acide hydroxy correspondant :*



b) *Oxydation de l'acide α -oxy-isocaproïque ainsi obtenu avec formation d'acétone par action de l'acide chromique en solution acétique.*



c) *Séparation quantitative de l'acétone par distillation et dosage de cette acétone par la réaction de Farbinyi.*

2° DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

L'on opère exactement comme dans le cas de la valine, à cette seule différence près que l'oxydation des oxy-acides (oxydation sous pression) se fait au bain-marie bouillant pendant 4 heures, au lieu de 3 heures dans le cas de la valine.

La quantité de leucine cherchée s'obtient finalement en

multipliant la quantité d'acétone trouvée par $\frac{1}{v} \cdot \frac{131}{58}$,

soit $\frac{2,26}{v}$. On verra ci-dessous que, traitée selon la méthode

décrite plus haut, la leucine donne naissance à 58 % de la quantité théorique d'acétone : on a donc ici $v = 0,58$.

Obtention de la courbe de référence ; détermination de la quantité d'acétone produite au cours du traitement de la leucine ; mesure de v .

Comme dans le cas de la valine, nous exprimons le rendement en acétone produite à partir de la leucine traitée selon la technique décrite plus haut, par

$$v = \frac{\text{acétone produite}}{\text{acétone théorique}}$$

Nous avons déterminé la valeur de v en fonction de la quantité de leucine mise en jeu, de façon analogue au cas précédent, concernant la valine. Le tableau VIII donne les résultats obtenus, résultats à partir desquels est tracée

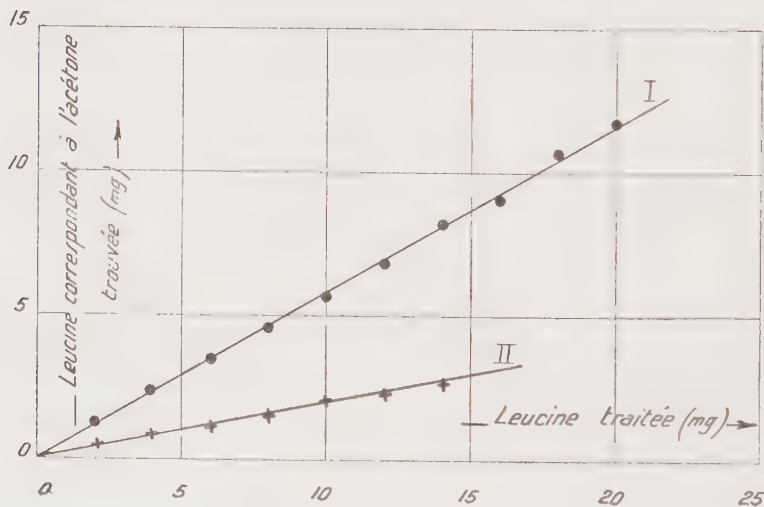


FIG. 3

la courbe de référence (courbe I, fig. 3) permettant le dosage de la leucine. Cette courbe se présente sous l'aspect d'une droite rigoureuse ; comme dans le cas de la valine, v est donc une constante, égale ici à 58.

TABLEAU VIII

Durée de l'oxydation : 4 heures.

Leucine traitée (mg.)	Acétone théorique (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	$v \times 100$	Observations	
				Volume du distillat acétonique (cc.)	Volume prélevé pour la colorimétrie (cc.)
0	0	0	0	50	2
2	0,885	0,565	64	50	2
4	1,77	1,053	59	50	2
6	2,655	1,55	58	50	2
8	3,54	2,03	57	100	2
10	4,425	2,54	58	100	2
12	5,31	3,03	57	100	2
14	6,193	3,62	58	100	1,8
16	7,08	4,03	57	100	1,5
18	7,965	4,71	59	100	1,0
20	8,85	5,18	58	100	1,0

3° DISCUSSION DE LA MÉTHODE

a) *Nécessité de la transformation de l'acide aminé en oxy-acide préalablement à l'oxydation par l'acide chromique.*

La nécessité de la désamination préalable de la leucine pour sa transformation ultérieure en acétone par oxydation ressort des chiffres du tableau IX, chiffres qui correspondent aux conditions expérimentales suivantes : 10 mg. de leucine sont dissous dans 20 cc. d'eau distillée, on ajoute 4 cc. de la solution d'acide chromique à 10 % et 4 cc. d'acide acétique pur, puis on porte au bain-marie bouillant. Le produit de la distillation du mélange oxydant est ensuite neutralisé par KOH et amené à un volume convenable.

TABLEAU IX

Durée de l'oxydation (heures)	Leucine retrouvée par colorimétrie (mg.)	‰ de la quantité théorique	Observations	
			Volume du distillat acétonique (cc.)	Volume prélevé pour la colorimétrie (cc.)
2	0,364	3,6	50	2
4	0,500	5	50	2

b) *Influence de la durée de l'oxydation sur la quantité d'acétone formée à partir de l'acide α -oxy-isocaproïque.*

Pour déterminer le temps nécessaire pour l'obtention, à partir de la leucine, de la quantité maxima d'acétone, nous avons effectué sur cet acide aminé des essais analogues à ceux qui ont été précédemment décrits à propos du dosage de la valine. Ces essais ont montré que, pour obtenir les résultats cherchés, l'oxydation de l'acide α -oxy-isocaproïque par l'acide chromique doit être effectuée au bain-marie bouillant pendant au moins 4 heures. Il apparaît ainsi que la résistance de l'acide α -oxy-isocaproïque vis-à-vis de l'oxydation chromique est sensiblement plus grande que celle de l'acide α -oxy-isovalérianique ; d'autre part, le rendement en acétone est ici légèrement inférieur (58 au lieu de 65 %).

c) *Influence de la présence d'autres acides aminés ; spécificité de la méthode.*

Il était utile de montrer, comme dans le cas de la valine, que la leucine, en présence d'une série d'acides aminés autres que la valine, donne des résultats constants en ce qui concerne la formation d'acétone ; les chiffres des tableaux X et XI mettent en évidence la spécificité du dosage.

TABLEAU X

Dosage spécifique de la leucine en présence d'un mélange d'acides aminés.

Le mélange est constitué par 9 mg. de chacun des acides aminés suivants : sérine, acide aspartique, glycocolle et cystéine. Durée de l'oxydation : 4 heures. 5 cc. de solution d'acide chromique à 10 % + 4 cc. d'acide acétique pur.

Leucine présente (mg.)	Acétone théorique correspondant à la leucine (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	Leucine trouvée (mg.)	% de la quantité théorique
0	0	0	0	—
2	0,885	0,565	2,18	109
3	1,327	0,810	3,15	105
4	1,77	1,04	4,06	102
6	2,65	1,56	6,06	101
8	3,54	2,05	7,95	99
10	4,42	2,52	9,80	98
12	5,31	3,00	11,7	98
14	6,19	3,4	13,4	95

TABLEAU XI

Dosage de la leucine en présence d'un mélange d'acides aminés.

Le mélange est constitué par 9 mg. de chacun des acides aminés suivants : isoleucine, acide glutamique, tyrosine, tryptophane. Durée de l'oxydation : 4 heures. 5 cc. de solution d'acide chromique à 10 % + 4 cc. d'acide acétique pur.

Leucine présente (mg.)	Acétone théorique correspondant à la leucine (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	Leucine trouvée (mg.)	% de la quantité théorique
0	0	0	0	—
2	0,885	0,565	2,18	109
3	1,327	0,790	3,07	102
4	1,77	1,01	3,95	99
6	2,65	1,55	6,05	101
8	3,54	2,00	7,82	98
10	4,42	2,50	9,72	97
12	5,31	3,00	11,70	98
14	6,19	3,57	14,00	100

**III. — Dosages spécifiques de la valine et de la leucine,
ces deux acides aminés existant simultanément
dans un mélange d'acides aminés quelconques**

La méthode qui vient d'être décrite permet le dosage de la valine ou de la leucine dans un mélange d'acides aminés quelconques mais à la condition qu'il n'y ait ni leucine présente dans le cas du dosage de la valine, ni valine présente dans le cas du dosage de la leucine. Malgré ces restrictions, cette méthode peut rendre de grands services, croyons-nous, notamment dans l'étude de la synthèse fermentaire de la valine ou de la leucine. Mais il est plus intéressant encore de pouvoir doser simultanément ces deux acides aminés lorsqu'ils sont en présence l'un de l'autre ; c'est là, en effet, le cas le plus général, tel qu'il se rencontre par exemple dans l'analyse des matières protéiques.

Pour arriver à ce résultat, nous avons mis au point une méthode dont le principe consiste à réaliser l'oxydation chromique par deux procédés différents, dans des conditions telles que les quantités d'acétone formées, dans chaque procédé, à partir de chacun des deux acides aminés, valine et leucine, soient nettement différentes, chacun des deux oxy-acides correspondants se comportant, au cours de son oxydation chromique, comme s'il était seul. Une équation simple permet alors le calcul des quantités cherchées de valine et de leucine.

Description de la méthode.

La solution contenant le mélange des oxy-acides provenant de la désamination des acides aminés, effectués com-

me il a été dit plus haut, est divisé en deux parts égales ; la première est traitée par la solution acétique d'acide chromique au bain-marie bouillant pendant 4 heures comme dans le cas où l'on a affaire à la leucine seule ; c'est le mode d'oxydation que nous qualifions d'*oxydation sous pression*. Nous appellerons *a* la quantité totale d'acétone formée dans ces conditions.

L'autre moitié est traitée par *oxydation et distillation directe*, de la façon suivante : concentrée sous vide jusqu'à un volume de 10 à 15 cc., elle est ensuite transvasée dans une éprouvette graduée de 50 cc. ; on rince le ballon dans lequel a eu lieu la concentration sous vide avec un minimum d'eau qui sert à ramener le volume de la solution des oxy-acides à 20 cc. La solution est alors placée dans une boule à brome qui sera adaptée à un ballon Pyrex de 100 cc. ; le ballon où a eu lieu la concentration sous vide est rincé de nouveau par 10 à 15 cc. d'eau qui sont complétés à 20 cc. dans l'éprouvette graduée ; on transvase ces 20 cc. d'eau de lavage dans le ballon Pyrex de 100 cc. dans lequel on introduit ensuite 5 cc. de la solution d'acide chromique à 10 %, et auquel on adapte la boule à brome contenant les 20 cc. de la solution des oxy-acides, et un réfrigérant ; ce réfrigérant et le ballon récepteur auquel il aboutit sont identiques à ceux qui, utilisés pour la distillation de l'acétone après oxydation sous pression, ont été décrits plus haut. On chauffe ensuite le tout à flamme très douce et lorsque l'ébullition commence, on laisse tomber goutte à goutte la solution des oxy-acides contenue dans la boule à brome. L'addition de cette solution est réglée de telle sorte qu'elle soit totale en 20 à 22 minutes ; les vitesses de distillation et d'addition doivent être telles que le volume du liquide en ébullition reste pratiquement constant. Quand la solution des oxy-acides est ainsi complètement introduite, on rince l'entonnoir à robinet par 5 cc. d'eau que l'on fait ensuite

passer dans le ballon en maintenant l'ébullition encore trois à quatre minutes, ce qui fait que la distillation dure au total 25 minutes. Le distillat, recueilli dans le ballon récepteur, est ensuite transvasé dans un ballon jaugé convenable, puis on dose l'acétone produite (*b*).

La connaissance de l'acétone formée au cours de l'oxydation chromique sous pression (*a*), et celle de l'acétone formée par l'oxydation et distillation directe (*b*), permet de calculer les quantités respectives de valine et de leucine présentes initialement dans le mélange d'acides aminés traité.

CALCUL DES QUANTITÉS DE VALINE ET DE LEUCINE

Soit :

- x* la quantité d'acétone théorique correspondant à la valine ;
- y* la quantité d'acétone théorique correspondant à la leucine ;
- a* la quantité d'acétone totale produite au cours de l'oxydation chromique sous pression ;
- b* la quantité d'acétone totale produite au cours de l'oxydation et distillation directe ;
- u* le rendement en acétone produite, à partir de la valine, au cours de l'oxydation chromique sous pression ;
- u'* le rendement en acétone produite, à partir de la valine, au cours de l'oxydation et distillation directe ;
- v* le rendement en acétone produite, à partir de la leucine, au cours de l'oxydation chromique sous pression ;
- v'* le rendement en acétone produite, à partir de la leucine, au cours de l'oxydation et distillation directe.

On a :

$$\left. \begin{array}{l} ux + vy = a \\ u'x + v'y = b \end{array} \right\} (1)$$

d'où l'on tire facilement :

$$\left. \begin{array}{l} y = \frac{\frac{u'}{u} - a - b}{\frac{u'}{u} - v - v'} \\ x = \frac{a - vy}{u} \end{array} \right\} (2)$$

Nous avons donné précédemment (tableaux II et VIII) les résultats de mesures de u et de v . La détermination de u' et de v' se fait en traitant des quantités connues de valine ou de leucine par la méthode impliquant l'oxydation et la distillation directe. Les résultats obtenus sont les suivants :

TABLEAU XII

Mesure du rendement en acétone formée à partir de la valine traitée par la méthode d'oxydation et distillation directe.

Valine traitée (mg.)	Acétone théorique (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	$u' \times 100$
0	0	0	—
2	0,99	0,720	73
3	1,435	1,09	78
4	1,98	1,42	72
6	2,97	2,23	75
8	3,96	2,81	71
10	4,95	3,61	73
12	5,94	4,03	68

TABLEAU XIII

Mesure du rendement en acétone formée à partir de la leucine traitée par la méthode d'oxydation et distillation directe.

Leucine traitée (mg.)	Acétone théorique (mg.)	Acétone trouvée (mg.)	$v' \times 100$
0	0	0	—
2	0,885	0,190	21,5
3	1,327	0,302	22,6
4	1,77	0,387	21,8
6	2,65	0,525	19,8
8	3,54	0,682	19,3
10	4,42	0,915	20,7
12	5,31	1,04	19,5
14	6,19	1,17	18,9

Les chiffres des tableaux XII et XIII montrent d'une part que les valeurs de u' et de v' , égales ici respectivement à 0,72 et à 0,21 (courbes II des fig. 2 et 3) sont, comme celles de u et v , pratiquement constantes, indépendantes des quantités de valine et de leucine présentes ; et, d'autre part, que les valeurs des quatre coefficients u , u' , v et v' sont suffisamment éloignées les unes des autres pour justifier l'application des équations [2].

Remarquons d'ailleurs que les valeurs respectives de ces quatre coefficients sont des valeurs empiriques, dépendant des conditions expérimentales, et par conséquent susceptibles de varier légèrement d'un laboratoire à l'autre, selon les modes de chauffage, le genre des ballons utilisés, etc. Chaque opérateur doit donc les déterminer préalablement. Ces coefficients jouent en somme un rôle analogue à celui des constantes des appareils utilisés pour le dosage des acides volatils par la méthode de Duclaux.

2° JUSTIFICATION DE LA MÉTHODE

Nous avons appliqué la méthode qui vient d'être décrite au dosage de quantités connues de leucine et de valine, ces deux acides aminés étant soit seuls en solu-

tion, soit en présence d'une série d'autres acides aminés. Les conditions d'oxydation étant ici telles que $u = 0,65$, $v = 0,53$, $u' = 0,72$, $v' = 0,21$, on a :

$$y = \frac{1,11 a - b}{0,38} \qquad x = \frac{a - 0,53 y}{0,65}$$

Les résultats sont donnés dans les tableaux XIV et XV.

TABLEAU XIV

Dosage de la valine et de la leucine en solution ne contenant que ces deux acides aminés.

Acides aminés traités traités (mg.)				Trouvé (mg.)			
Valine	Leucine	a	b	Valine	Erreur %	Leucine	Erreur %
2	12	3,63	1,85	1,90	— 5	12,6	+ 5
4	10	3,98	2,47	3,92	— 2	11,6	+ 16
6	8	—	3,00	—	—	—	—
6	6	3,36	2,86	6,7	+ 12	5,2	— 13
8	6	4,23	3,65	8,6	+ 8	6,25	+ 4
10	4	4,30	4,16	10,7	+ 7	3,63	— 9
12	2	4,37	4,60	12,5	+ 4	1,49	— 26

TABLEAU XV

Dosage de la valine et de la leucine en présence de 36 mg. d'un mélange à poids égaux des acides aminés suivants : glycocolle, cystéine, β -alanine, acide aspartique, acide glutamique, sérine, tryptophane, proline, arginine, tyrosine, isoleucine, lysine.

Acides aminés traités, 36 m. du mélange, plus :				Trouvé (mg.)			
Valine	Leucine	a	b	Valine	Erreur %	Leucine	Erreur %
0	0	0	0	—	—	—	—
2	8	2,535	1,48	2,07	+ 4	8,00	0
4	6	2,71	2,065	4,40	+ 10	5,60	— 7
5	5	2,945	2,40	5,37	+ 8	5,17	+ 4
6	4	3,00	2,67	6,45	+ 8	3,93	— 2
8	2	3,06	3,08	8,11	+ 1	1,90	— 5

Il apparaît ainsi qu'il est possible d'obtenir, à quelques centièmes près, la teneur d'un mélange quelconque d'acides aminés en valine et en leucine, pour des quantités de valine et de leucine comprises entre 2 et 20 mg. de chacun de ces acides aminés.

RESUME

1° La méthode indiquée par Kendall et Friedemann pour le dosage de l'alanine n'est nullement spécifique de cet acide aminé ; les modifications que Fürth et ses collaborateurs ont apporté à cette méthode, dans le but de la rendre spécifique, n'ont atteint ce but que partiellement, et par des moyens compliqués.

Le présent travail montre qu'il suffit d'ajouter à la solution des hydroxyacides provenant de la désamination des acides aminés, le dixième de son volume d'une solution d'acétate mercurique 5 % pour empêcher, au cours de l'oxydation ultérieure par le permanganatè, toute production d'acétaldéhyde à partir de la sérine et de l'acide aspartique ; dans ces conditions, l'acétaldéhyde formé ne provient plus que de l'alanine. La réaction colorimétrique donnée par l'acétaldéhyde avec le nitroprussiate de soude et la pipérazine permet d'en faire le dosage spécifique en présence des autres aldéhydes fournis par les autres acides aminés. Il est ainsi possible de doser l'alanine d'une façon rigoureusement spécifique en présence d'acides aminés quelconques. Cette méthode permet la détermination, à 5 % près, de 2 mg. et plus d'alanine.

En modifiant les conditions d'oxydation par le permanganate (augmentation de la concentration en SO_4Mn , et de la durée d'oxydation) et en supprimant l'addition d'acétate mercurique, on obtient une production quantitative d'acétaldéhyde à partir de l'ensemble alanine + sérine + acide aspartique ; il est ainsi possible de doser la somme de ces trois acides aminés en présence d'acides aminés quelconques, et de déterminer, par conséquent, la teneur

d'un mélange d'acides aminés quelconques en alanine d'une part et en l'ensemble sérine + acide aspartique, de l'autre. Les chiffres obtenus correspondent à 95 à 97 % de la teneur réelle en alanine, et à 93 à 95 % de la teneur réelle en sérine + acide aspartique.

2° Le présent travail donne également une méthode pour doser soit la valine dans un mélange d'acides aminés quelconques, mais en l'absence de leucine, soit la leucine dans un mélange d'acides aminés quelconques, mais en l'absence de valine. Cette méthode est basée sur les opérations suivantes : transformation des acides aminés en les acides β -hydroxy correspondants par traitement par l'acide nitreux, oxydation sous pression des acides β -hydroxy par l'acide chromique et dosage de l'acétone formée ; des courbes de référence, préalablement établies, permettent facilement de déterminer les quantités cherchées de valine ou de leucine à quelques centièmes près.

En outre, en utilisant simultanément avec le premier procédé d'oxydation, un second mode d'oxydation (oxydation et distillation directe), il est possible de doser séparément la valine et la leucine en présence l'une de l'autre dans un milieu d'acides aminés quelconques. Ce dosage repose sur le fait que chacun des deux oxyacides correspondant à la valine et à la leucine se comporte, au cours de son oxydation chromique, comme s'il était seul ; ce dosage implique d'autre part la détermination préalable de quatre coefficients empiriques représentant le rendement en acétone produite à partir de la valine et de la leucine, au cours des deux modes d'oxydation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. DESNUELLE. — *Thèse Sciences, Lyon*, 1935.
- [2] A. I. KENDALL et Th. E. FRIEDMANN. — *Journ. of Infections Diseases*, 47, 171, 1930.
- [3] O. FURTH. — *Biochem. Zs.*, 251, 404, 1932.
- [4] D. B. JONES et O. MOELLER. — *J. biol. Chemistry*, 79, 429, 1928.
- [5] Th. E. FRIEDEMANN, M. COTONIO et A. SCHAFER. — *Journ. biol. Chemistry*, 73, 335, 1937.
- [6] C. NEUBERG. — *Biochem. Zs.*, 67, 134, 1914.
- [7] G. DENIGÈS. — *C. R. Ac. Sciences*, 130, 32, 1900.
- [8] P. DESNUELLE. — *Enzymologia*, 5, 37, 1938.
- [9] E. ABDERHALDEN. — *Zs. phys. Chem.*, 37, 499, 1902.
- [10] D. B. JONES et O. MOELLER. — *Proc. Amer. Soc. Biol. Chem.*, 31, 54, 1937.
- [11] F. W. FOREMAN. — *Biochem. Jl.*, 12, 290, 1919.
- [12] R. KUHN et P. DESNUELLE. — *Ber. Chem. Ges.*, 70, 1907, 1937.
- [13] — *Zs. Phys. Chem.*, 251, 19, 1938.
- [14] A. I. VIRTANEN et T. LAINE. — *Nature*, 142, 754, 1938.
- [15] R. FABINYI. — *Chem. Centralbl.*, 302 (1900, 11).
- [16] C. URBACH. — *Biochem. Zs.*, 236, 164, 1931.

DEUXIÈME THESE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

OBTENTION INDUSTRIELLE
DE QUELQUES ACIDES GRAS PAR FERMENTATION
DE RÉSIDUS DE DISTILLERIE

Lu et accepté:

LES MEMBRES DU JURY,

L. MEUNIER.

CI FROMAGEOT.

P. DESNUELLE.

Vu et approuvé :

LE DOYEN DE LA FACULTÉ
DES SCIENCES DE LYON,

DOUIN.

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 4 Mai 1939.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE.



BOSC FRÈRES, M. & L. RIOU

°° °° °° IMPRIMEURS-ÉDITEURS °° °° °°

°° **42, QUAI GAILLETON, 42** °°

°° °° °° °° **LYON** °° °° °° °°



